

30.10.03  
0.4 JAN 2004

# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: Invenzione Industrial

N. TO2002 A 000582



REC'D 10 NOV 2003

WIPO PCT

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma, il ..... 30 LUG. 2003

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

IL DIRIGENTE

*Elena Marinelli*  
Sig.ra E. MARINELLI

**BEST AVAILABLE COPY**

## AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA, COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - TORINO

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA**Residenza **FERRARA**

FE

codice **0043460234**2) Denominazione **ASSOCIAZIONE VENETA PER LA LOTTA ALLA TALASSEMIA**Residenza **ROVIGO**

RO

codice **80009850290**

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome **ANGELO GERBINO**

(Iscr. N. 488BM)

ed altri.

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza **Jacobacci & Partners S.p.A.**via **CORSO Regio Parco**

n. 27

città **TORINO**cap **10152** (prov) **TO**

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via **=====**

n. 27

città **=====**cap **=====** (prov) **=====**

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/ec)

gruppo/sottogruppo

**NUOVO USO DELLA RAPAMICINA E DI SUOI ANALOGHI STRUTTURALI**ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:  SI  NO  XSE ISTANZA: DATA **11/11/02** N° PROTOCOLLO **11111111**

## E. INVENTORI DESIGNATI cognome nome

1) **BIANCHI NICOLETTA**3) **GAMBARI ROBERTO**

cognome nome

2) **BORGATTI MONICA**4) **MISCHIATI CARLO**

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato

S/R

1) **=====**n. **=====**2) **=====**n. **=====**

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

**I TITOLARI PARTECIPANO AI DIRITTI SUL BREVETTO NELLE SUEGUENTI MISURE  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA 90 %, ASSOCIAZIONE VENETA PER LA  
LOTTA ALLA TALASSEMIA 10%, AI SENSI DELL'ART. 19 R.D. 1127/39**

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA CARICO SEGUONO

N. es.

Doc. 1)  PROV n. pag. **13** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) ....

Doc. 2)  PROV n. tav. **00** disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) ....

Doc. 3)  RIS dichiarazione sostitutiva di certificazione  
lettera d'incarico, procure o riferimento preciso generale ....

Doc. 4)  RIS designazione inventore ....

Doc. 5)  RIS documenti di priorità con traduzione in italiano ....

Doc. 6)  RIS autorizzazione o atto di cessione ....

Doc. 7)  RIS nominativo completo del richiedente ....

8) attestato di versamento, totale lire **CENTOTTANTOTTO/51** obbligatorioCOMPILATO IL **10/11/2002** FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) **ANGELO GERBINO**CONTINUA SINO **NO**DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO **SI**

SCIOLGIMENTO RISERVE	Data	N° Protocollo
<b>=====</b>	<b>=====</b>	<b>=====</b>
confronta singola priorità		
<b>=====</b>	<b>=====</b>	<b>=====</b>

Jacobacci &amp; Partners S.p.A.

C.C.I.A.A. DI TORINO

**10 2002 A 000582**codice **01**VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA **10 2002 A 000582**

L'anno mille novemila duecento Due mila due

il giorno

Quattro

del mese di

Luglio

Il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. **00** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopramenato.

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE  
ANGELO GERBINOUmbra  
Giovanni  
TorinoL'UFFICIALE ROGANTE  
Mirella CAVALLARI

RIASSUNTO INIZIAZIONE CON DISEGNO ED INVENTARIO

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA  
Residenza FERRARA FE

D. TITOLO

NUOVO USO DELLA RAPAMICINA E DI SUOI ANALOGHI STRUTTURALI

Classe proposta (sez/cl/sci)       

(gruppo/sottogruppo)       /      

E. RIASSUNTO

E' descritto l'uso della rapamicina e dei suoi analoghi strutturali per la preparazione di un medicamento per il trattamento terapeutico della beta-talassemia.



F. DISSEGNI

C.C.I.A.A.  
TORINO

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:  
"Nuovo uso della rapamicina e di suoi analoghi strutturali"

Di: Università degli Studi di Ferrara, nazionalità italiana, Via Savonarola 9, Ferrara (IT); Associazione Veneta per la lotta alla Talassemia, nazionalità italiana, c/o Centro di Microcitemia dell'Azienda ULSS 18, Rovigo, (IT).

Inventori designati: BIANCHI, Nicoletta; BORGATTI Monica; GAMBARI, Roberto; MISCHIATI, Carlo.

Depositata il: 4 luglio 2002

 2002 A000582

\* \* \* \*

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce all'uso della rapamicina come molecola in grado di indurre il differenziamento cellulare eritroide e di incrementare la produzione di RNA messaggero per la gamma-globina; si propone tale molecola per la preparazione di un medicamento per il trattamento terapeutico della beta-talassemia.

L'esistenza di sostanze in grado di indurre l'espressione del gene per la gamma-globina e la biosintesi di emoglobina fetale (HbF) in soggetti adulti è nota da tempo (1). Nella maggior parte dei casi, tali sostanze sono anche in grado di attivare o potenziare la

trascrizione dei geni per le globine embrionali e fetali in sistemi sperimentali modello.

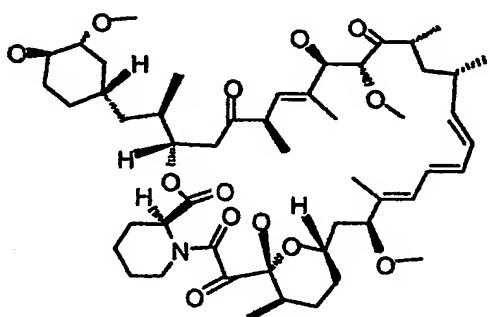
Recentemente, ad esempio, sono state descritte numerose molecole leganti il DNA aventi la capacità di indurre un aumento dell'espressione dei geni per la gamma-globina (2). Tra queste, citiamo il cisplatino e analoghi del cisplatino, la mitramicina e la cromomicina, la tallimustina (3). Queste molecole sono efficaci modulatori dell'espressione dei geni per la globina gamma.

Nell'essere umano, l'attivazione della trascrizione dei geni per le globine gamma in soggetti adulti conduce alla produzione di emoglobina fetale mimando il fenotipo HPFH (High Persistence of Fetal Hemoglobin) che conferisce un quadro clinico favorevole a pazienti affetti da beta-talassemia, anche in forma omozigote (4). Una terapia che preveda l'impiego di tali molecole nel trattamento di pazienti affetti da beta-talassemia potrebbe pertanto rendere tali soggetti maggiormente indipendenti dalla terapia trasfusionale (5).

Alla base della presente invenzione vi è la necessità di nuovi modificatori del processo di trascrizione utilizzabili nel trattamento della beta-talassemia che presentino un elevato livello di induzione dell'espressione dei geni gamma-globinici e un

basso livello di citotossicità.

E' stato da noi sorprendentemente trovato che la rapamicina, un antibiotico descritto nella tecnica nota, la cui formula di struttura è di seguito illustrata, soddisfa tali requisiti.



RAPAMICINA

In particolare, è stato trovato che la rapamicina attiva l'espressione del gene per la globina gamma umana.

La rapamicina è un antibiotico prodotto da *Streptomyces hygroscopicus* e originariamente descritto come antifungino (6).

La sintesi chimica della rapamicina e di suoi analoghi strutturali - ad esempio analoghi 7-(N-idrossi)-acilici, -carbamoilici e -ureidici - è stata descritta da diversi gruppi di ricerca (si vedano ad esempio i riferimenti bibliografici 7 e 8).

Tale molecola è il principio attivo di farmaci



(Sirolimus, Rapamune, antibiotico AY22989) utilizzati come agenti antiinfiammatori (9, 10) nel trattamento della dermatite atopica (9), della dermatite allergica da contatto (9) e della psoriasi (10), come agenti antitumorali (11, 12) e antifungini (6). Inoltre, la rapamicina è largamente utilizzata in terapia come farmaco in grado di rallentare il processo di rigetto (13) in trapianti di cuore (14), rene (15) e fegato (16).

Tuttavia l'attività della rapamicina come attivatore dell'espressione del gene della globina gamma umana non era stata fino ad ora descritta, né tale attività è riconducibile ai sui effetti noti sopra indicati.

Un primo oggetto della presente invenzione è pertanto l'uso della rapamicina e suoi analoghi strutturali per la preparazione di un medicamento per il trattamento terapeutico della beta-talassemia.

Inoltre, come è stato recentemente descritto (17, 18), un trattamento combinato con diversi modificatori del processo di trascrizione permette di incrementare ulteriormente l'espressione dei geni per la globina gamma.

Perciò, un secondo oggetto della presente invenzione è l'uso della rapamicina o suoi analoghi strutturali in combinazione con almeno un ulteriore modificatore del

processo di trascrizione per la preparazione di un medicamento per il trattamento della beta-talassemia.

Secondo una forma di attuazione preferita, detto ulteriore modificatore del processo di trascrizione è scelto nel gruppo costituito da citosina arabinoside, acido retinoico, plicamicina, idrossiurea, guanina, guanosina trifosfato (GTP), guanosina difosfato (GDP) e guanosina monofosfato (GMP); tra questi sono maggiormente preferiti citosina arabinoside ed acido retinoico.

L'attività della rapamicina come induttore del differenziamento cellulare eritroide e della produzione di mRNA per la gamma-globina è stata valutata in colture di cellule umane. I risultati di tale studio sono illustrati nelle tabelle riportate nella sezione relativa agli esempi. I dati ottenuti indicano che l'attività della rapamicina rispetto a farmaci di riferimento (ad esempio l'idrossiurea nell'induzione di HbF) è superiore; inoltre è stato verificato che l'effetto citotossico riscontrabile è molto inferiore a quello dell'idrossiurea.

Gli esempi che seguono vengono forniti a scopo di illustrazione e non sono intesi a limitare in alcun modo la portata dell'invenzione.

Esempio 1

La valutazione dell'attività biologica della rapamicina è stata condotta esaminando la capacità di tale composto di modulare l'espressione dei geni per la globina gamma nella linea cellulare umana K562, che è in grado di differenziare in senso eritroide esprimendo i geni per la globina gamma se sottoposta a trattamento con modificatori della risposta biologica adatti a tale scopo (3, 17, 18). Il livello di differenziamento è stato valutato analizzando la positività delle cellule alla benzidina (3). Alcuni tra i dati ottenuti sono riportati in Tabella 1, che rappresenta i risultati di sei esperimenti indipendenti (media  $\pm$  SD). Come si può facilmente notare, la rapamicina è in grado di indurre un incremento della percentuale di cellule K562 positive alla benzidina (40-45% nelle cellule trattate, paragonato al 4,1% delle cellule K562 di controllo). La produzione di emoglobina è stata valutata mediante elettroforesi su acetato di cellulosa e colorazione del gel con una soluzione a base di benzidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3). L'emoglobina prodotta in modo preponderante da cellule K562 trattate con la rapamicina è l'Hb Portland (alpha2gamma2). L'espressione dei geni codificanti per le globine gamma è stata valutata mediante RT-PCR (reverse transcriptase PCR) quantitativa (3). I dati ottenuti dimostrano un aumento dell'accumulo

intracitoplasmatico di mRNA per la globina gamma. Tali valutazioni sono state eseguite dopo 6 giorni di induzione con 20 nM rapamicina. I risultati della RT-PCR quantitativa sono mostrati in Tabella 2.

Tabella 1

Composto	Concentrazione (nM)	<sup>a</sup> Differenziamento eritroide (%)
-	-	4,1±3,7
Rapamicina	20	45,5±5,8

<sup>a</sup> Differenziamento eritroide = percentuale di cellule K562 positive alla benzidina (media ± SD di 6 esperimenti).

Tabella 2

Composto	Concentrazione (nM)	<sup>b</sup> mRNA per la globina gamma
-	-	1
Rapamicina	20	2,4

<sup>b</sup> L'accumulo di RNA per la globina gamma è riportato in tabella come incremento rispetto a quello di cellule K562 di controllo non trattate. La tecnica utilizzata è quella della RT-PCR quantitativa (21, 22) utilizzando i seguenti oligonucleotidi primer e sonda: gamma-globin forward primer, 5'-TGG CAA GAA GGT GCT GAC TTC-3'; gamma-globin reverse primer, 5'-TCA CTC AGC TGG GCA AAG



G-3'; sonda gamma-globin, 5'-FAM-TGG GAG ATG CCA TAA AGC ACC TGG-TAMRA-3' (FAM = 6-carbossi fluoresceina, TAMRA = 6-carbossi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina).

Esempio 2

Per verificare se la rapamicina fosse in grado, oltre ad indurre il differenziamento delle cellule K562, di stimolare la produzione di mRNA per la gamma-globina in precursori eritroidi umani isolati da sangue periferico, è stata utilizzata la tecnica pubblicata da Fibach et al. (19, 20). Questa tecnica prevede due fasi: nella prima fase le cellule isolate da sangue periferico di un soggetto sano o affetto da una patologia emopoietica, come l'anemia falciforme o la  $\beta$ -talassemia, vengono seminate in terreno di coltura addizionato del 10% di medium condizionato derivante dalla linea cellulare di carcinoma di vescica 5637. La seconda fase consiste nel coltivare le cellule isolate in un terreno di coltura adatto, addizionato dell'ormone eritropoietina, 30% di siero fetale bovino, 2-mercaptopropano, albumina, glutamina e desametasone per permettere la proliferazione e la maturazione delle cellule staminali di tipo eritroide. In questa fase le cellule possono essere trattate con potenziali induttori di HbF.

Ad esempio, in questo sistema è stato dimostrato che

l'idrossiurea, un inibitore della sintesi di DNA utilizzato attualmente in terapia sperimentale della  $\beta$ -talassemia, è in grado di indurre la produzione di HbF.

I risultati ottenuti con la rapamicina hanno dimostrato un incremento nella produzione di mRNA per la gamma-globina in cellule trattate con rapamicina rispetto alle stesse non trattate (3,75 volte), superiore a quello riscontrabile usando idrossiurea (Tabella 3).

Tabella 3

Composto	Concentrazione ( $\mu$ M)	<sup>a</sup> mRNA per la globina gamma
-	-	1
Rapamicina	3	3,73
Idrossiurea	120	2,25

a L'accumulo di RNA per la globina gamma è riportato in Tabella come incremento rispetto a quello di precursori eritroidi di controllo non trattati. La tecnica utilizzata è quella della RT-PCR quantitativa (21, 22) utilizzando gli oligonucleotidi primer e sonda descritti in Tabella 2.

Riferimenti bibliografici

1. Rodgers GP, Rachmilewitz EA, British J. Haematology, 91:263-268, 1995.

2. Rochette J, Craig JE e Thein SL, *Blood Reviews*, 8: 213-224, 1994.
3. Bianchi N, Chiarabelli C, Borgatti M, Mischiati C, Fibach E, Gambari R. *Br J Haematol.* 113(4):951-61, 2001.
4. Dover, G.J., Brusilow, S e Samid D, *New England Journal of Medicine*, 327: 569-570, 1992.
5. Ikuta, T., Atweh, G., Boosalis, V., White, G.L., De Fonseca, S., Boosalis, M., Faller, D.V., Perrine, S.P., *Annals of New York Academy of Sciences*, 850:87-99, 1998.
6. Kahan BD. Sirolimus: a comprehensive review. *Expert Opin Pharmacother.* 2001 Nov;2(11):1903-17.
7. Dickman DA, Ding H, Li Q, Nilius AM, Balli DJ, Ballaron SJ, Trevillyan JM, Smith ML, Seif LS, Kim K, Sarthy A, Goldman RC, Plattner JJ, Bennani YL. *Bioorg Med Chem Lett.* 10(13):1405-8, 2000.
8. Dell CP. *Curr Med Chem.* 5(3):179-94, 1998.
9. Trautmann A, Akdis M, Schmid-Grendelmeier P, Disch R, Brocker EB, Blaser K, Akdis CA. *J Allergy Clin Immunol.* 108(5):839-46, 2001.
10. Reitamo S, Spuls P, Sassolas B, Lahfa M, Claudy A, Griffiths CE. *Br J Dermatol.* 145(3):438-45, 2001.
11. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. *Nat Med.* 8(2):128-35, 2002.

12. Garber K. J Natl Cancer Inst. 93(20):1517-9, 2001.
13. Benito AI, Furlong T, Martin PJ, Anasetti C, Appelbaum FR, Doney K, Nash RA, Papayannopoulou T, Storb R, Sullivan KM, Witherspoon R, Deeg HJ. Transplantation. 72(12):1924-9, 2001.
14. Radovancevic B, El-Sabrout R, Thomas C, Radovancevic R, Frazier OH, Van Buren C. 33(7-8):3221-2, 2001.
15. Podbielski J, Schoenberg L. Prog Transplant. 11(1):29-32, 2001.
16. Nishida S, Pinna A, Verzaro R, Levi D, Kato T, Khan F, Nery J, Weppler D, Tzakis A. Transplant Proc. 33(1-2):1495, 2001.
17. Bianchi N, Ongaro F, Chiarabelli C, Gualandi L, Mischiati C, Bergamini P, Gambari R. Biochem Pharmacol. 60:31-40, 2000.
18. Bianchi N, Osti F, Rutigliano C, Ginanni Corradini F, Borsetti E, Tomassetti M, Mischiati C, Feriotto G e Gambari R, British Journal of Haematology, 104:258-263, 1999.
19. Fibach E. Hemoglobin, 22: 445-458, 1998.
20. Fibach E, Burke KP, Schechter AN, Noguchi CT & Rodgers GP. Blood, 81: 1630-1635, 1993.
21. Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM. Genome Research, 6: 986-994, 1996.
22. Gibson UE, Heid CA & Williams PM. Genome Research, 6: 995-1001, 1996.



RIVENDICAZIONI

1. Uso della rapamicina e suoi analoghi strutturali per la preparazione di un medicamento per il trattamento terapeutico della beta-talassemia.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detta rapamicina o analogo strutturale è in combinazione con almeno un altro modificatore del processo di trascrizione scelto nel gruppo che consiste di citosina arabinoside, acido retinoico, plicamicina, mitramicina, idrossiurea, guanina, guanosina trifosfato (GTP), guanosina difosfato (GDP) e guanosina monofosfato (GMP).

JACOBACCI & PARTNERS S.p.A.

PER INCARICO  
ANGELO GERBINO  
(scr. No. 4083M)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**